

Europäisches Patentamt
European Patent Office
Office européen des brevets



(11) Veröffentlichungsnummer: 0 431 327 A1

(12)

EUROPÄISCHE PATENTANMELDUNG

(21) Anmeldenummer: 90121189.6

(51) Int. Cl. 5: A61K 39/145, A61K 39/385

(22) Anmeldetag: 06.11.90

(30) Priorität: 10.11.89 DE 3937412

(43) Veröffentlichungstag der Anmeldung:
12.06.91 Patentblatt 91/24

(84) Benannte Vertragsstaaten:
AT BE CH DE DK ES FR GB GR IT LI LU NL SE

(71) Anmelder: HOECHST AKTIENGESELLSCHAFT
Postfach 80 03 20
W-6230 Frankfurt am Main 80(DE)

(72) Erfinder: Jung, Günther

Ob der Grafenhalde 5

W-7400 Tübingen(DE)

Erfinder: Rammensee, Hans-Georg

Sommerhalde 3

W-7400 Tübingen(DE)

Erfinder: Deres, Karl

Gartenstrasse 200

W-7400 Tübingen(DE)

Erfinder: Wiesmüller, Karl-Heinz

Rappenberghalde 33

W-7400 Tübingen(DE)

(54) Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

(57) Eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, besteht aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens.

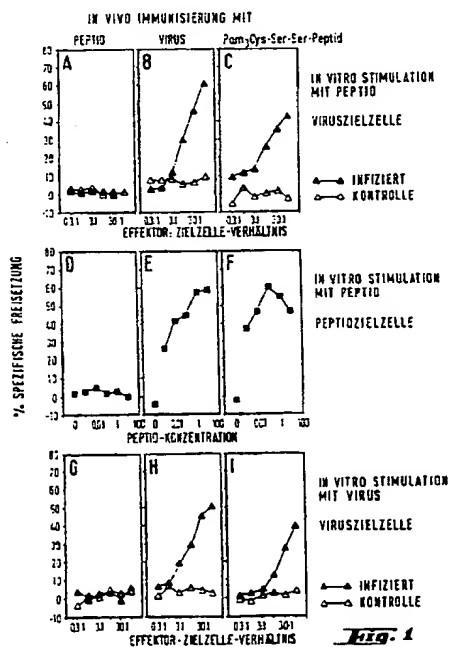


FIG. 1

SYNTETISCHE VAKZINE ZUR SPEZIFISCHEN INDUKTION ZYTOTOXISCHER T-LYMPHOZYTEN

Die vorliegende Erfindung betrifft eine synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten.

Zytotoxische T-Lymphozyten (Killer-T-Zellen) stellen einen wesentlichen Teil der Immunantwort von Warmblütern gegen intrazelluläre Infektionen dar. Zytotoxische T-Lymphozyten werden normalerweise nur mittels einer in-vivo-Impfung mit infektiösen Erregern induziert (J. Bastin et al., J. Exp. Med., Vol 165, June 1987). Wegen der damit verbundenen Risiken würde ein synthetischer Impfstoff für die spezifische Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten eine erhebliche Verbesserung darstellen. Es wurde nun überraschenderweise gefunden, daß durch die Verwendung bestimmter Membranankerwirkstoffkonjugate enthaltend Killer-T-Zellepitope die spezifische in-vivo-Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten möglich ist.

Es ist zwar bereits bekannt, daß Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper geeignet sind (vgl. Angew. Chem. 97 (1985), Nr. 10, S. 883 ff.); Über eine synthetische Vakzine enthaltend Membranankerwirkstoffkonjugate zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten wurde jedoch bisher nicht berichtet.

Erfindungsgegenstand ist demzufolge eine synthetische Vakzine zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, die dadurch gekennzeichnet ist, daß sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer Partialsequenz enthaltend mindestens ein Killer-T-Zellepitop eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.

Die genannte Membranankerverbindung ist vorzugsweise ein bakterielles Lipoprotein. Besonders bevorzugt ist als Membranankerverbindung eine Verbindung der nachstehenden Formeln

25

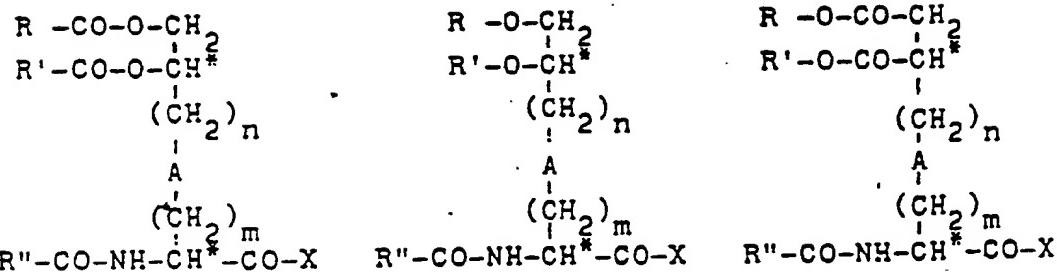
30

35

40

45

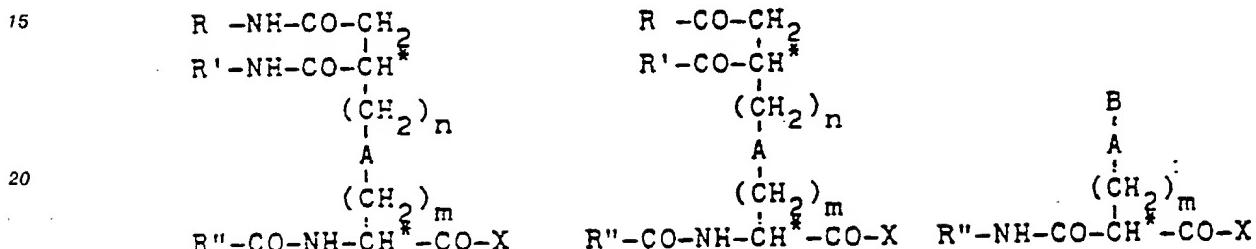
50



I.

II.

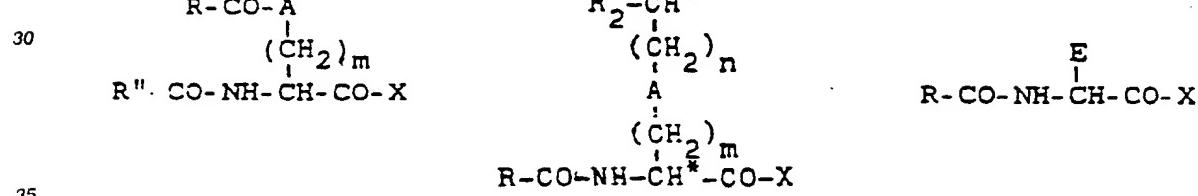
III.



IV.

V.

VI.



VII.

VIII.

IX.

40

in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;

n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;

C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,

45 C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist, R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder artifiziellen α -Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind aufgeführten Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.

Von diesen sind als Beispiele besonders hervorzuheben: In bakteriellem Lipoprotein vorkommende N-Termini, wie z.B.: Y-Ser-Ser-Ser-Asn, Y-Ile-Leu-Leu-Ala, Y-Ala-Asn-Asn-Gln, Y-Asn-Ser-Asn-Ser, Y-Gly-Ala-Met-Ser, Y-Gln-Ala-Asn-Tyr, Y-Gln-Val-Asn-Asn, Y-Asp-Asn-Ser-Ser, wobei Y einer der unter Formel I bis VII aufgeführten Reste sein kann. Diese Lipopentapeptide können auch in verkürzter Form (Lipodi-, Lipotri- oder Lipotetrapeptide) als Membranankerbindung eingesetzt werden. Ganz besonders bevorzugt ist N-

Palmitoyl-S-[2,3(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-serin ($\text{Pam}_3\text{Cys-Ser-Ser}$), N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-seryl-glycin und N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)propyl]-cysteinyl-alanyl-D-isoglutamin.

Weiterhin besonders bevorzugt sind die Verbindungen der Formeln I und III, insbesondere Verbindungen der Formel I.

Der Substituent A ist vorzugsweise Schwefel oder Methylen, besonders bevorzugt Schwefel.

Die Substituenten R, R' und R'' sind vorzugsweise Alkylreste mit 14 bis 18 C-Atomen; besonders bevorzugt sind Alkylreste mit 16 C-Atomen.

Der Substituent X wird vorzugsweise gebildet aus 1 bis 2 polaren Aminosäureresten, besonders bevorzugt ist der Serin-Rest.

Für die erfindungsgemäße Vakzine eignen sich zur Kopplung an die Membranankerverbindung unterschiedliche Proteine oder Protein-Partialsequenzen von intrazellulär auftretenden Krankheitserregern, Viren-, Bakterien- oder Parasiten-Proteinen oder von Tumor-Antigenen, die von Killer-T-Zellen erkannt werden.

Solche Proteine oder Partialsequenzen (auch als Killer-T-Zell-Epitope bezeichnet) zeichnen sich durch aus, daß sie von zytotoxischen T-Lymphozyten zusammen mit MHC-Molekülen (major histocompatibility complex) erkannt werden.

Die erfindungsgemäße Vakzine eignet sich zur Immunisierung gegen alle Erreger, die Killer-T-Zell-Epitope aufweisen, wie z. B. gegen Adenoviren, HIV, Influenza-Viren, LCMV, MCMV, Hepatitis-Viren, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis, Plasmodien, Listerien, Mycobakterien oder Leishmanien. Bisher bereits bekannte Killer-T-Zell-Epitope sind die in der nachfolgenden Tabelle aufgeführten Partialsequenzen, von denen das Influenza-Nukleoprotein P₃CSS-NP 147-158 (R⁻) und die HIV-Epitope eine Sonderstellung einnehmen.

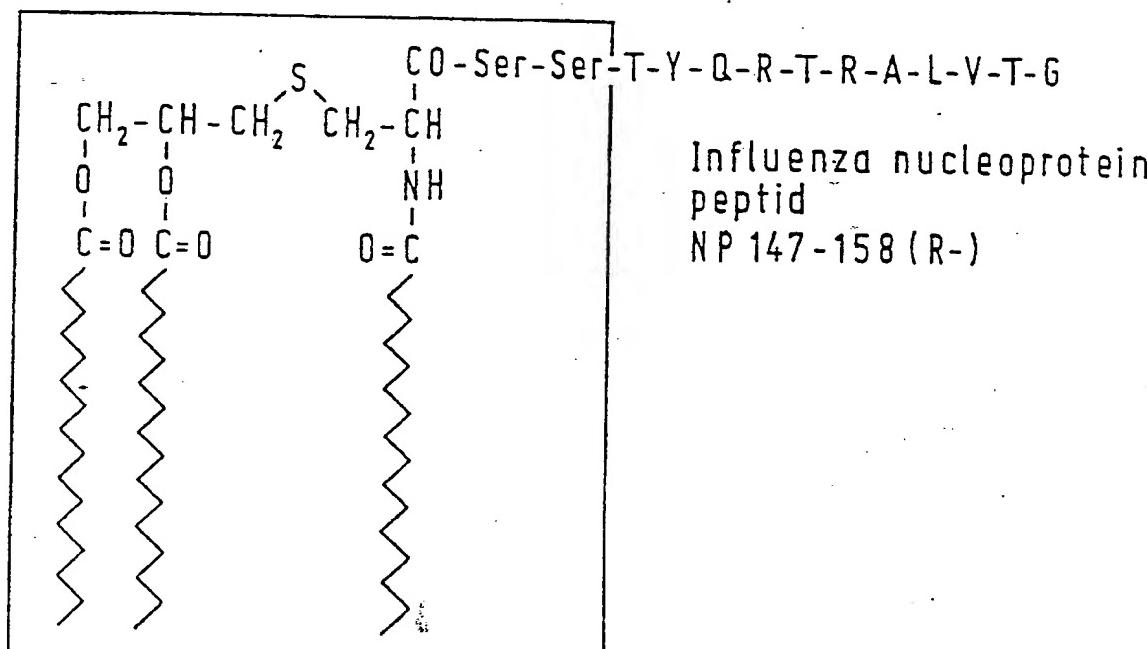
25

30

35

40

45



Lipotripeptid $\text{Pam}_3\text{Cys-Ser-Ser}$

50

55

	Organismus	Protein	von - bis	Restr.	Sequenz
5	Adenovirus Ad5E1A			Db	PSNTPPEI
HIV	env (gp 120)	381-392	HLA A2	(K)NCGGEFFYCNS	
HIV	env (gp 120)	308-322	Dd	R1QRGRPGRAFVTIGK	
HIV	env (gp 120)	410-429	DR4	GSDTITLPCRIKQFINMWQE	
HIV	gag (p17)	418-443	A2	KEGHQMKDCTERQANF	
HIV	gag (p17)	446-460	A2	GNFLQSRPEPTAPPA	
10	HIV	gag (p24)	193-203	A2	GHQAAMEMLKE
HIV	gag (p24)	219-233	A2	HAGPLAPGQMREPRG	
HIV	gag (p24)	265-280	B27	KRWIIILGLNKIVRMYC	
Influenza	Nucleoprotein	82-94	HLA A2	MVVKLGEFYQNQMM	
Influenza	Matrix	57-68	HLA A2	KGILGFVFTLTV	
15	Influenza	Nucleoprotein	335-349	B37 B44 A2 Aw69	SAAFEDLRVLSFIRG
Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD	
Influenza	Hemagglutinin H3	58-73	H-2 Ad	ILDGIDCTLIDALLGD	
Influenza	Hemagglutinin	181-204	H-2K;H-2K 103-123	-	
20	Influenza	Nucleoprotein	365-379		SDYEGRLIQNSLTI
Influenza	Nucleoprotein	335-349	H-2b	IASNENMETMESSTL	
Influenza	Nucleoprotein	384-393	HLA B27	RYWAIRTRSG	
Influenza	Nucleoprotein	147-158	Kd	TYQRTRALV (R) TG	
25	A/NT/60/68	Nucleoprotein	118-126	Ld Lq	RPQASGVYM
LCMV					VENPGGYCL
LCMV	-	278-286	H-2b	VENPGGYCLTKWMILA	
-	-	277-293	H-2b	YPHFMPTNL	
-	-	168-176	-	GRLMYDMYPHFMPTNLGPS	
30	MCMV	-	161-179	Ld	ISTQNHRALDLVA
P815	Tumor antigen P91A	12-24	Ld		
Plasmodium falciparum, berghlei	Circumsporozoite prot.	368-390	H-2K	KPKDELDYENDIEKKICKMEKCSC	
35	yoelii	Circumsporozoite prot.	249-260	Kd	NDDSYIPSAEKI
-	-	276-288	Kd	NEDSYVPSAEQI	
Hepatitis B	HBsAg	21-28	-	PLGFFPDH	

40

Mit Hilfe der erfindungsgemäßen Vakzine ist es darüber hinaus möglich, verschiedene Membrananker-verbindungen, gekoppelt an verschiedene Partialsequenzen zu mischen, um eine auf ein bestimmtes Ziel optimal abgestimmte Vakzine zu erhalten. Weiterhin kann eine entsprechende Mischung zusätzlich Membranankerwirkstoffkonjugate enthalten, die die humorale Immunantwort stimulieren und zusätzlich zur Produktion von neutralisierenden Antikörpern führen (Vaccine 7, 29 - 33 (1989), Angew. Chem., Int. Ed. 24, 872 - 873 (1989)). Darüber hinaus ist es auch möglich, verschiedene Partialsequenzen kovalent zu verknüpfen und mit einer Membranankerverbindung zu verbinden.

Erfindungsgegenstand ist weiterhin ein Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine, das dadurch gekennzeichnet ist, daß Proteine oder Partialsequenzen von Erregern durch eine Konjugationsreaktion an die Membranankerverbindung gebunden wird. Die Konjugationsreaktion kann z. B. eine Kondensation, Addition, Substitution, Oxidation oder Disulfidbildung sein. Bevorzugte Konjugationsmethoden sind in den Beispielen wiedergegeben. Weitere Konjugationsmethoden sind in der bereits zitierten Deutschen Offenlegungsschrift 35 46 150 beschrieben.

Die Herstellung der Membranankerverbindungen ist ebenfalls in der zuletzt genannten deutschen Offenlegungsschrift ausführlich beschrieben.

Die gegebenenfalls nötige Trennung der Diastereomeren kann nach unterschiedlichen Methoden, wie z. B. in Hoppe-Seyler's Z. Physiolog. Chem. 364 (1983) 593 beschrieben erfolgen.

Der Aufbau der für die Membranankerwirkstoffkonjugate einzusetzenden Partialsequenzen kann auf

unterschiedliche, literaturbekannte Weise erfolgen, vgl. z. B. Wünsch et al. in Houben-Weyl, Bd. 15/1.2, Stuttgart, Thieme-Verlag oder Wünsch in Angew. Chem. 83 (1971), E. Gross und J. Meienhofer (Herausgeb.), The Peptides, Vol. 1 (1979), 2 (1979), 3 (1981) und 5 (1983) Academic Press, New York 7713 oder die Deutsche Offenlegungsschrift 35 46 150. In Beispiel 1 wird ein bevorzugtes Verfahren zur Herstellung einer Partialsequenz und eines Konjugats näher erläutert.

Weiterhin gehören zum Erfindungsgegenstand pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zübereitungen, die einen Gehalt an Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und mindestens einer Partialsequenz eines der genannten Proteine oder Organismen aufweisen. Normalerweise werden zusätzlich neben einem Lösungsmittel keine zusätzlichen Hilfs- und Trägerstoffe oder Adjuvantien für die erfundungs-gemäßen Zübereitungen benötigt. In manchen Fällen kann es aber sinnvoll sein, derartige Hilfs- und/oder Trägerstoffe sowie gegebenenfalls Adjuvantien den erfundungsgemäßen Zübereitungen zuzusetzen (Anton Mayr, Gerhard Eißenen, Barbara Mayr-Bibrack, Handbuch der Schutzimpfungen in der Tiermedizin, 1984, Verlag Paul Parey, Berlin-Hamburg).

Die Menge an Vakzine, die für eine sichere Immunisierung eines Warmblüters notwendig ist, hängt ab von der Art des Warmblüters, von der bzw. den Membranankerverbindungen und dem Protein oder der bzw. den Partialsequenzen des Organismus, gegen den immunisiert werden soll und ist im Einzelfall empirisch zu ermitteln.

Durch die nachfolgenden Beispiele soll die Erfindung näher erläutert werden.

20 Synthese

Beispiel 1

Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP 147-158

25 Die Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Peptidsequenz wurde durch Festphasenpeptidsynthese synthetisiert. Es wurden Fmoc-Aminosäuren benutzt. Folgende Seitenkettenenschutzgruppen kamen zur Anwendung: Thr(tBu), Tyr(tBu), Arg(Pmc). Es wurde 1 g para-Benzoyloxybenzylalkohol-Harz, beladen mit 0,5 mmol Fmoc-Gly eingesetzt und die Peptidsequenz nach folgenden Synthesezyklen aufgebaut. N-Aktivierung mit 50 % Piperidin in DMF (1 x 10 min). Kupplung der folgenden Aminosäure für 30 min mit BOP/HOBT [Benzotriazol-1-yl-oxy-tris-(dimethyl amino)-phosphoniumhexafluorophosphat/1-Hydroxybenzo-triazol] und Diisopropylethylamin in DMF. Es wurden jeweils Doppelkupplungen mit 3-fachem Überschuß an Fmoc-Aminosäure und 4,5-fachem Überschuß an Diisopropylethylamin (jeweils bezogen auf freie Aminogruppen am Harz) durchgeführt. Nach jeder Doppelkupplung wurde das Peptidharz je dreimal mit N-Methylpyrrolidon, Dichlormethan und N-Methylpyrrolidon gewaschen.

30 Nach der Synthese der harzgebundenen Influenza A-Virus-Nukleoprotein-Sequenz wurde ein Teil des Peptids durch Trifluoressigsäurespaltung gewonnen und auf Reinheit geprüft mittels HPLC, MS, Aminosäureanalyse, Analyse auf chiraler Phase sowie Sequenzanalyse. Die HPLC-Prüfung ergab eine Reinheit von über 90 %. Nach Kupplung von zwei Serinresten [Fmoc-Ser(tBu)] an das harzgebundene Peptid, erfolgte die Kupplung des Tripalmitoyl-S-glycerincysteins nach der DIC/HOBT-Methode. Nach vier Stunden wurde ein Äquivalent N-Methylmorpholin hinzugefügt und nach einer weiteren Stunde wurde das Lipopeptid-Harz gewaschen. Das Lipopeptid wurde von 100 mg Harz mittels 2 ml Trifluoressigsäure (mit 100 µl Thioanisol und 100 µg Thikresol) innerhalb von einer Stunde getrennt. Um die Arg(Pmc)-Schutzgruppen vollständig zu entfernen, wurde zusätzlich 30 min bei 50 °C mit Trifluoressigsäure nachbehandelt. Das Filtrat wurde eingedampft, der Rückstand mit Essigsäure aufgenommen und in kalten Ether gegeben. Das ausgefallene Lipopeptid wurde 3 x mit Ether gewaschen und aus tert.-Butanol/Wasser im Verhältnis 3 : 1 lyophilisiert.

Beispiel 2

Synthese von N-Palmitoyl-S-[2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl]cysteinyl-seryl-seryl-NP (365-380)

50 Die Synthese erfolgte analog Beispiel 1. Es wurden Fmoc-Aminosäuren mit folgenden Seitenketten-schutzgruppen benutzt: Ser(tBu), Glu(OtBu), Thr(tBu). Asn wurde ohne Seitenkettenenschutzgruppe mittels Diisopropylcarbodiimid/HOBT gekuppelt. Als Ausgangsharz wurde Fmoc-Glu(OtBu)-p-Benzoyloxybenzylalkohol-Polystyrol, quervernetzt mit 1 % Divinylbenzol, eingesetzt. Die Beladung an Fmoc-Glu(OtBu) betrug 0,45 mmol/g. Die Abspaltung des Peptids und Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptids von je 100 mg Harz erfolgte mit 2 ml Trifluoressigsäure unter Zusatz von 0,1 ml Thioanisol und 100 µg Thikresol innerhalb von 90 min. Die Sequenz wurde durch Sequenzanalyse des freien Peptids bestätigt; durch HPLC-

Prüfung wurde ein einheitlicher Peak mit über 90 % ermittelt. Aminosäurenanalyse und Prüfung auf Enantiomerenreinheit an chiraler Phase ergaben die erwarteten Werte.

Wirksamkeitstests

5

A)

Unter SPF-Bedingungen gezüchtete, 3 Monate alte BALB/c-Inzuchtmäuse wurden intravenös mit 100 µg Pam₃cys-Ser-Ser-[NP 147-158] immunisiert. (100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158], aufgenommen in 10 300 µl PBS, 1 min beschallt). Nach 28 Tagen wurden die Mäuse mit 0,2 bzw. 0,4 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus A/PR/8 intranasal infiziert. Analog wurden zur Kontrolle Mäuse infiziert, denen 300 µl PBS intravenös appliziert wurde. Der Verlauf der Infektion wurde anhand von täglichen Gewichtskontrollen und der Überlebensrate kontrolliert. 11 von 12 Kontrolltieren, die mit 0,4 haemagglutinierenden Einheiten infiziert wurden, starben nach 11 Tagen an der Virusinfektion, während von den immunisierten Tieren nur 4 von 12 starben.

Eine weitere Kontrollgruppe und eine mit Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] immunisierte Gruppe wurden mit 0,2 haemagglutinierenden Einheiten Influenza-Virus infiziert. Nach 18 Tagen lebten noch 40 % der Kontrolltiere (4 von 10 Tieren), während 75 % der immunisierten Tiere lebten. Am Tag 18 betrug die Gewichtsdifferenz zwischen immunisierten Tieren und Kontrolltieren 4 g. Die überlebenden Tiere der Kontrollgruppe verloren weiter an Gewicht, während sich die immunisierten Tiere langsam von der Infektion erholten.

B)

25 Zytotoxische T-Zell-Aktivität von Milzzellen aus BALB/c-Mäusen nach Immunisierung mit freiem Peptid, Virus oder Pam₃Cys-Ser-Ser-Peptid (Fig. 1)

BALB/c-Mäuse erhielten durch intravenöse Applikation in 300 µl PBS

- a) 8 × 10⁷ mit 1,6 µM Nukleoproteinpeptid 147-158 (R-) vorinkubierte, syngene Milzzellen; (A, D, G),
- b) 8 × 10⁷ mit 160 µM Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R)-]Lipopeptid vorinkubierte, syngene Milzzellen; (C,F),
- c) 50 haemagglutinierende Einheiten von Influenza A-Virus PR/8/34; (B,E,H),
- d) 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158 (R)]; (I).

Nach 6 Tagen wurden den immunisierten bzw. infizierten Tieren die Milzen entnommen und die Milzzellen 5 Tage lang mit Peptid (A bis F) oder mit Virus PR8 infizierten, syngenen Stimulatorzellen (G,H,I) restimuliert. Dazu wurden je 2,5 × 10⁷-Zellen kultiviert in 10 ml a-MEM-Medium (Hersteller: Gibco), angereichert mit 10 % fötalem Kälberserum, 2-Mercaptoethanol, Glutamin und Antibiotika unter Zusatz von entweder 80 nM NP 147-158(R)-Peptid (A,F) oder von 5 × 10⁶-Virus PR8-infizierten, mit 20 Gy bestrahlten syngenen Milzzellen (G,H,I). Die Infektion von Stimulator und Zielzellen wurde wie beschrieben durchgeführt (Eur. J. Immunol. 7, 630 - 635 (1977)).

40 Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde durch einen ⁵¹Cr-Release-Standardtest (Eur. J. Immunol. 137, 2.676 -2.681 (1986)) ermittelt. Schaubilder A, B, C und G, H, I zeigen die CTL-Aktivität auf unbehandelte (Δ) oder PR8 infizierte (▲) P815 (MHC:H-2^d)-Zielzellen.

Schaubilder D, E und F zeigen CTL-Aktivität auf P815-Zellen, die mit verschiedenen Konzentrationen von freiem Peptid 30 min bei 37 °C vorbehandelt wurden. Hier wurde ein Verhältnis von Effektor zu Zielzelle 45 30 : 1 eingesetzt.

C)

Aktivität zytotoxischer T-Zellen nach Immunisierung von Mäusen mit Pam₃Cys- Ser-Ser-[NP 147-158] 50 oder Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365 - 380] (Fig. 2)

BALB/c-Mäuse (Schaubilder A,B) oder (B6 × DBA/2)-F1-Mäuse (C,D) wurden mit Influenza A-Virus (A,C) bzw. mit 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158] (Bild B) bzw. mit 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bild D) immunisiert. Nach 6 Tagen wurden die Milzen entnommen und die Milzzellen, wie unter B beschrieben, in Gegenwart von 0,8 µM NP 147-158 Peptid (A,B) bzw. 0,8 µM NP 365-380 Peptid (C,D) stimuliert. Die Aktivität der zytotoxischen T-Zellen wurde anschließend auf unbehandelte P815-Zielzellen (Δ), auf PR8 infizierte P815-Zielzellen (▲) und auf 90 min bei 37 °C mit NP 147-158-Peptid vorinkubierte P815-Zielzellen (■) geprüft; ebenso auf unbehandelte EL-4-(MHC H-2^d)-Zellen (○), auf PR8 infizierte EL-4-Zielzellen (*), und auf 90 min bei 37 °C mit NP 365-380-Peptid vorinkubierte EL-4-Zellen (◆).

D)

Prüfung auf MHC Klasse I-Restriktion und auf Spezifität der Immunisierung mit Lipopeptid (Fig. 3)

BALB/c-Mäuse (Bilder A,B,C) oder (86 x DBA/2)-F1-Mäuse (Bilder D-I) erhielten i.v. in 300 µl PBS 100

- 5 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bilder A,E,H) bzw. 50 µg Ser-Ser-[NP 147-158(R-)] (Bild B) bzw. 50 µg [NP 147-158(R-)] (Bild C) bzw. 50 haemagglutinierenden Einheiten Influenza PR8-Virus (Bilder D,G) bzw. 100 µg Pam₃Cys-Ser-Ser-[NP 365-380] (Bilder F,I).

Sechs Tage nach der Injektion wurden die Milzzellen, wie in Beispiel 2 beschrieben, kultiviert unter Zusatz von Nukleoprotein 147-158(R)-Peptid (Bilder A - F), oder Nukleoprotein 365-380-Peptid (Bilder G -

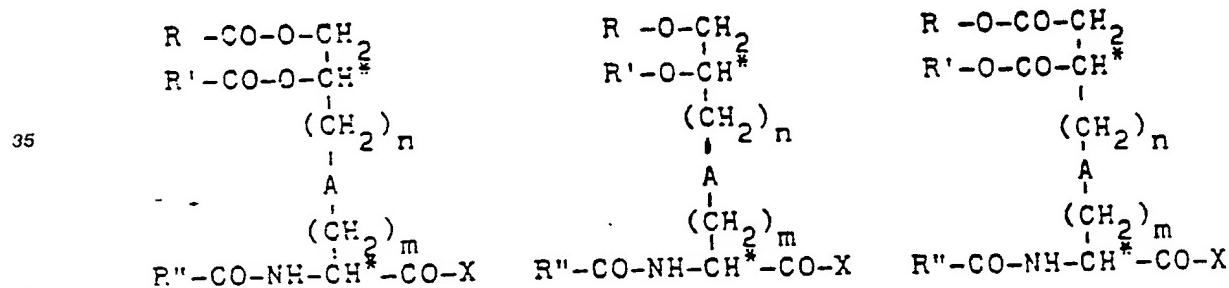
- 10 I). Die Aktivität der erhaltenen cytotoxischen T-Zellen wurde bestimmt gegen

- unbehandelte P815-Zielzellen (Δ)
- 90 min bei 37 °C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte P815-Zielzellen (\blacksquare)
- 90 min bei 37 °C mit NP 365-380 vorinkubierte P815-Zielzellen (\square)
- unbehandelte EL-4-Zielzellen (\circ)
- 15 - 90 min bei 37 °C mit NP 147-158(R-) vorinkubierte EL-4-Zielzellen (\diamond)
- 90 min bei 37 °C mit NP 365-380 vorinkubierte EL-4-Zielzellen (\blacklozenge).

Ansprüche

- 20 1. Synthetische Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten, dadurch gekennzeichnet, daß sie aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerverbindung und einem mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht.
- 25 2. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung ein bakterielles Membran-Lipoprotein ist.
- 30 3. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung eine der nachstehenden Formeln aufweist

30



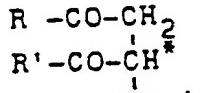
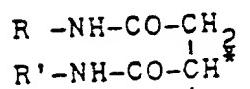
40

I.

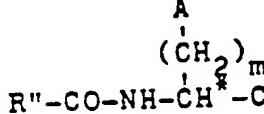
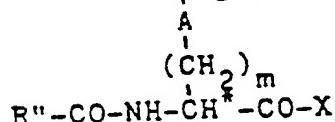
II.

III.

45



50

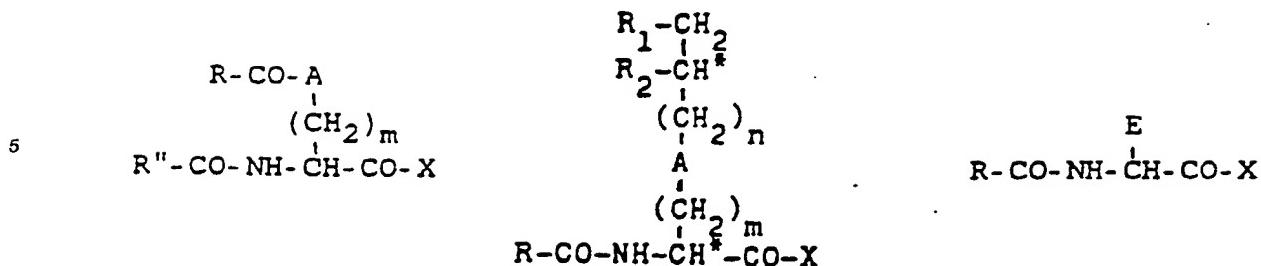


55

IV.

V.

VI.

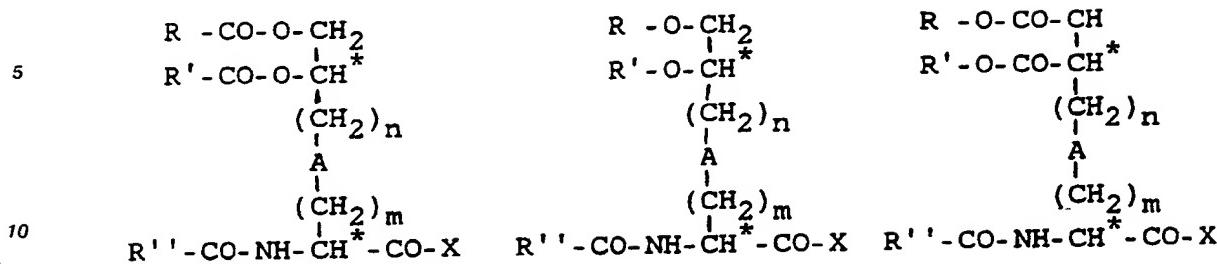


10.

VII.**VIII.****IX.**

- 15 in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;
 C' ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,
 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe
 mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen
 20 substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder
 artifiziellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V
 aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind
 und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder
 25 -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die
 Partialsequenz des Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder
 das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.
 4. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerbindung N-
 Palmitoyl-S- 2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den termina-
 len Serinrest gebunden ist.
 5. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 4, dadurch gekennzeichnet, daß
 das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-
 Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gonokokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder
 einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.
 6. Synthetische Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 5, dadurch gekennzeichnet, das
 35 ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen vorliegt.
 7. Synthetische Vakzine gemäß Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, das neben Membranankerwirkstoff-
 konjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeu-
 gung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.
 8. Verfahren zur Herstellung einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7,
 40 dadurch gekennzeichnet, daß ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert
 wird.
 9. Pharmazeutische oder veterinärmedizinische Zübereitung zur Induktion von zytotoxischen T-Lymphozyten,
 gekennzeichnet durch einen Gehalt an einer synthetischen Vakzine gemäß einem oder mehreren der
 Ansprüche 1 - 7, gegebenenfalls neben üblichen Hilfs- und/oder Trägerstoffen und gegebenenfalls neben
 45 weiteren Vakzinen.
 10. Verfahren zur Immunisierung von Menschen oder Säugetieren, dadurch gekennzeichnet, das eine
 Vakzine gemäß einem oder mehreren der Ansprüche 1 - 7 oder eine pharmazeutische oder veterinärmedi-
 zinische Zübereitung gemäß Anspruch 9 verabreicht wird.
 Patentansprüche für folgende Vertragsstaaten: ES, GR:
 50 1. Verfahren zum Herstellen einer synthetischen Vakzine zur spezifischen Induktion von zytotoxischen T-
 Lymphozyten, die aus einem Konjugat aus mindestens einer Membranankerbindung und einem minde-
 stens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Protein eines Virus, eines Bakteriums, eines Parasiten oder eines
 Tumorantigens oder mindestens einer mindestens ein Killer-T-Zellepitop enthaltenden Partialsequenz eines
 Virus-, Bakterium- oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens besteht, dadurch gekennzeichnet, daß
 55 ein Membranankerwirkstoffkonjugat nach bekannten Methoden synthetisiert wird.
 2. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerbindung ein bakterielles
 Membran-Lipoprotein ist.
 3. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerbindung eine der

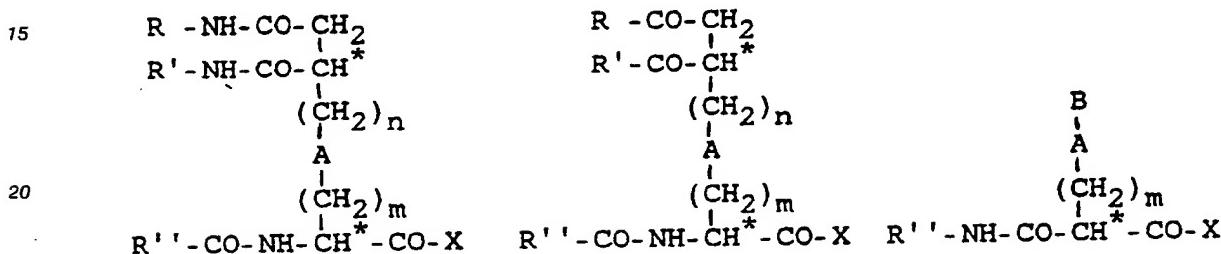
nachstehenden Formeln aufweist



I.

II.

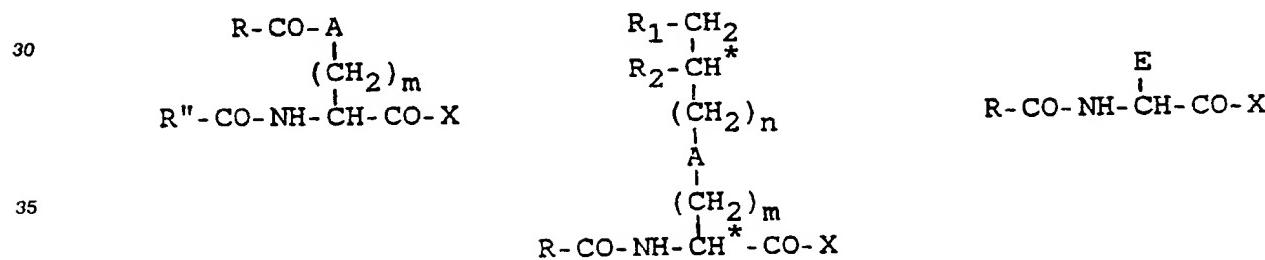
III.



IV.

V.

VI.



VII.

VIII.

IX.

- in denen A Schwefel, Sauerstoff, Disulfid (-S-S-), Methylen (-CH₂-) oder -NH- sein kann;
 n = 0 bis 5, m = 1 oder 2;
 C* ein asymmetrisches Kohlenstoffatom mit R- oder S-Konfiguration ist,
 45 R, R' und R'' gleich oder verschieden sind und Wasserstoff oder eine Alkyl-, Alkenyl- oder Alkinylgruppe mit 7 bis 25 Kohlenstoffatomen sind, welche mit Hydroxy-, Amino-, Oxo-, Acyl-, Alkyl- oder Cycloalkylgruppen substituiert sein kann, E in Formel IX Wasserstoff oder eine beliebige Seitenkette einer natürlichen oder artifiziellen Aminosäure sein kann, B in Formel VI die Bedeutung jedes der in den Formeln I - V aufgeführten -(CH₂)_n-(substituiertes Alkyl)-Reste haben kann und R₁ und R₂ gleich oder verschieden sind und dieselben Bedeutungen wie R, R' und R'' haben, aber auch -OR, -O-COR, -COOR, -NHCOR oder -CONHR sein können, wobei X eine Kette von bis zu 10 Aminosäuren ist, an die das Protein oder die Partialsequenz des Virus-, Bakterium-oder Parasiten-Proteins oder eines Tumorantigens gebunden ist, oder das Protein oder die Partialsequenz selbst ist.
 50 4. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß die Membranankerverbindung N-Palmitoyl-S-2,3-(bispalmitoyloxy)-propyl - cysteinyl-seryl-serin ist, wobei die Partialsequenz an den terminalen Serinrest gebunden ist.
 55 5. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß das Protein oder die Partialsequenz von einem Adenovirus, HIV, Influenza-Virus, LCMV, MCMV, Hepatitis-Virus, HTLV, FELV, Treponema pallidum, Gono-

kokkus, Bordetella pertussis oder Plasmodium spec. oder einem anderen ein Killer-T-Zell-Epitop enthaltenden Pathogen stammt.

6. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß ein Gemisch aus Membranankerwirkstoffkonjugaten mit verschiedenen Partialsequenzen hergestellt wird.

5 7. Verfahren nach Anspruch 1, dadurch gekennzeichnet, daß eine Vakzine hergestellt wird, in der neben Membranankerwirkstoffkonjugaten zur Induktion zytotoxischer T-Lymphozyten auch Membranankerwirkstoffkonjugate zur Erzeugung neutralisierender Antikörper vorhanden sind.

10

15

20

25

30

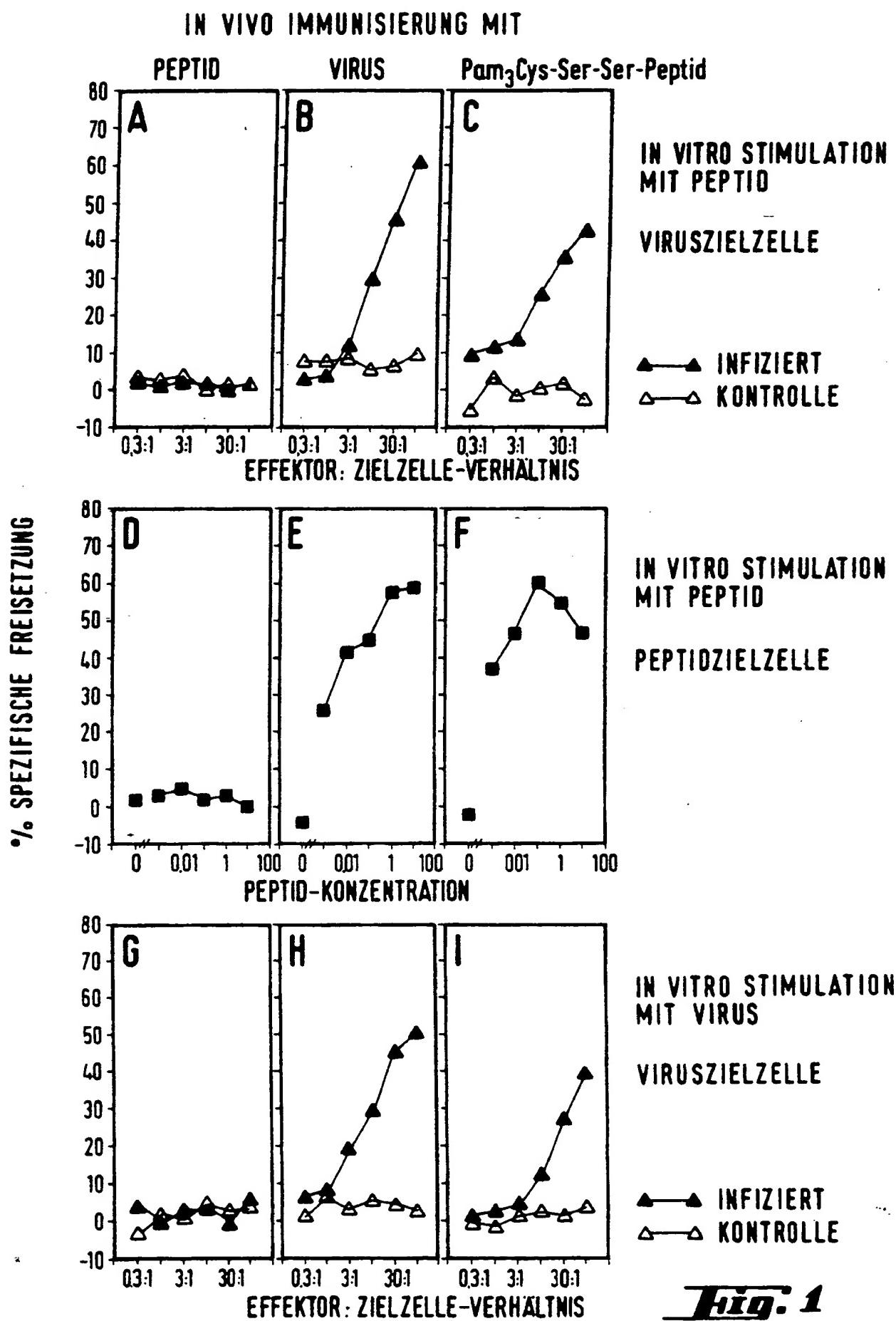
35

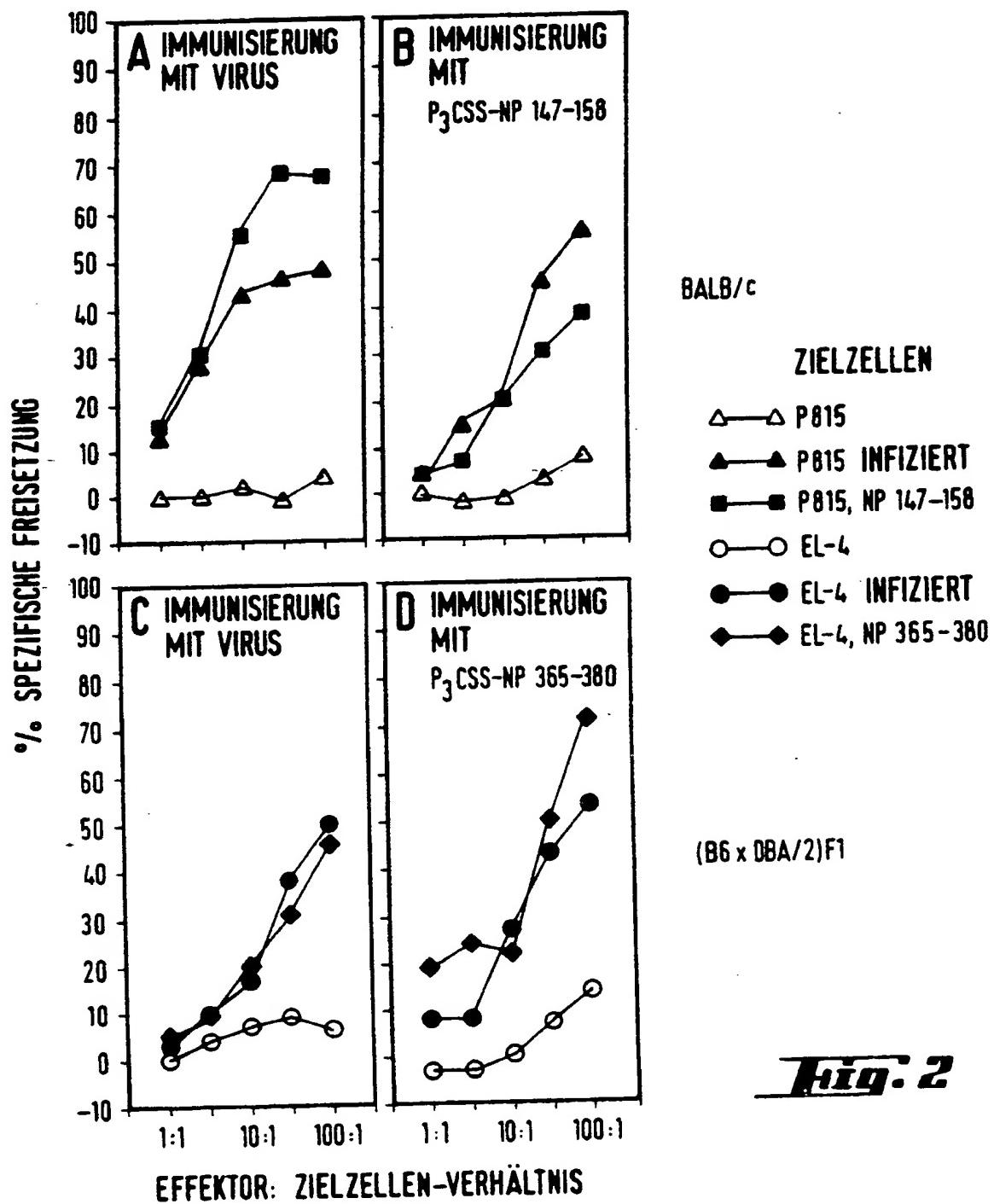
40

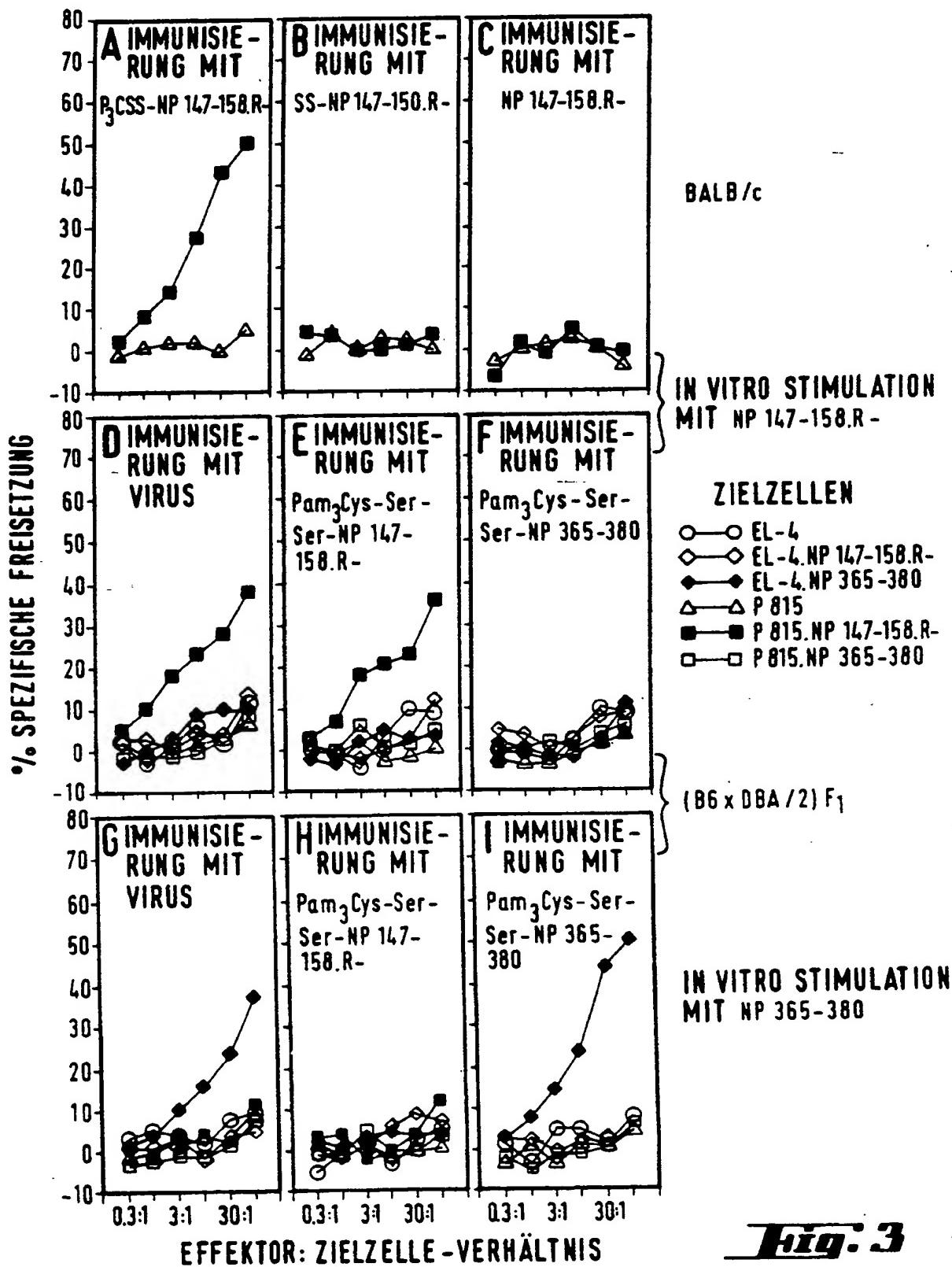
45

50

55

**Fig. 1**



**Fig. 3**



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT,
der nach Regel 45 des Europäischen Patent-
Übereinkommens für das weitere Verfahren als
europäischer Recherchenbericht gilt

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 1189

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	Betrieb Anspruch	KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl.4)
X,D	EP-A-0 210 412 (HOECHST AG.) * Insgesamt; besonderes Seite 7, Zeilen 5-23; Ansprüche *	1-9	A 61 K 39/145 A 61 K 39/385
Y	--	1-9	
Y	WO-A-89 02 277 (BOARD OF REGENTS, UNIVERSITY OF TEXAS SYSTEM) * Insgesamt; besonderes Seite 9, Zeilen 14-19 und Seite 24, Zeilen 27-30 *	1-9	
X,P	-- NATURE, Band 342, 30. November 1989, Seiten 561-564; K. DERES et al.: "In vivo priming of virus-specific cytotoxic T lymphocytes with synthetic lipo- peptide vaccine" . /.		RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl.4) A 61 K C 07 K
UNVOLLSTÄNDIGE RECHERCHE			
<p>Nach Auffassung der Recherchenabteilung entspricht die vorliegende europäische Patentanmeldung den Vorschriften des Europäischen Patentübereinkommens so wenig, daß es nicht möglich ist, auf der Grundlage einiger Patentansprüche sinnvolle Ermittlungen über den Stand der Technik durchzuführen.</p> <p>Vollständig recherchierte Patentansprüche: 1-9 Unvollständig recherchierte Patentansprüche: Nicht recherchierte Patentansprüche: 10 Grund für die Beschränkung der Recherche:</p> <p>Verfahren zur chirurgischen oder therapeutischen Behandlung des menschlichen oder tierischen Körpers (Siehe Art. 52(4) des Europäischen Patentübereinkommens)</p>			
Recherchenart	Abschlußdatum der Recherche	Prüfer	
DEN HAAG	25-02-1991	FERNANDEZ BRANAS	
KATEGORIE DER GENANNTEN DOKUMENTEN		E : älteres Patentdokument, das jedoch erst am oder nach dem Anmeldedatum veröffentlicht worden ist D : in der Anmeldung angeführtes Dokument L : aus anderen Gründen angeführtes Dokument & : Mitglied der gleichen Patentfamilie, übereinstimmendes Dokument	
X : von besonderer Bedeutung allein betrachtet Y : von besonderer Bedeutung in Verbindung mit einer anderen Veröffentlichung derselben Kategorie A : technologischer Hintergrund O : nichtschriftliche Offenbarung P : Zwischenliteratur T : der Erfindung zugrunde liegende Theorien oder Grundsätze			



Europäisches
Patentamt

EUROPÄISCHER TEILRECHERCHENBERICHT

Nummer der Anmeldung

EP 90 12 1189

-2-

EINSCHLÄGIGE DOKUMENTE			KLASSIFIKATION DER ANMELDUNG (Int. Cl. 4)
Kategorie	Kennzeichnung des Dokuments mit Angabe, soweit erforderlich, der maßgeblichen Teile	betrifft Anspruch	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 4)
	* Der ganze Artikel *	1-9	

A	EP-A-0 338 437 (HOECHST AG.)	1-9	
	* Insgesamt *	1-9	

A	EP-A-0 203 676 (THE WISTAR INSTITUTE OF ANATOMY AND BIOLOGY)	1-9	
	* Insgesamt *	1-9	RECHERCHIERTE SACHGEBiete (Int. Cl. 4)

A	WO-A-89 07 448 (REGENTS OF THE UNIVERSITY)	1-9	
	* Insgesamt *	1-9	

A	EP-A-0 000 300 (CIBA-GEIGY AG)	1-9	
	* Insgesamt *	1-9	

A	THE EMBO JOURNAL, Band 7, Nr. 1, 1988, Seiten 93-100, IRL Press Ltd, Oxford, GB; J.B. ROTHBARD et al.: "A sequence pattern common to T cell epitopes"	1-9	
	* Der ganze Artikel *	1-9	

A	CELL, Band 52, 1988, 29. Januari 1988, Seiten 253-258, Cell Press; H.C. BODMER et al.: "Enhanced recognition of a modified peptide antigen by cytotoxic T cells specific for influenza nucleoprotein"	1-9	
	* Der ganze Artikel *	1-9	
